

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-012293

(43)Date of publication of application : 19.01.1988

(51)Int.Cl.

C12P 19/04  
C08B 37/08

(21)Application number : 61-156774

(71)Applicant : KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD

(22)Date of filing : 03.07.1986

(72)Inventor : MURATA HIDEKI  
SHIOMI MICHIO  
ISHII SHINZO

## (54) PURIFICATION OF HYALURONIC ACID

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the titled compound useful as a raw material for cosmetic, etc., on an industrial scale at low cost, with a simple process using an inexpensive non-toxic chemical, by treating a liquid containing hyaluronic acid with a macroreticular anion exchange resin.

CONSTITUTION: A hyaluronic acid culture liquid is prepared by culturing Streptococcus zooepidemicus NCTC 7023 in a medium and the liquid is diluted with an ion-exchanged water and added with carbon to obtain a carbon treatment liquid. The liquid containing hyaluronic acid is passed through a column packed with a macroreticular anion exchange resin. The treated liquid is adjusted to 7.0pH with HCl, added with NaCl and then with acetone to precipitate sodium hyaluronate, which is separated, washed and dried to obtain the objective compound in purified state.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 昭63-12293

⑤ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 昭和63年(1988)1月19日

C 12 P 19/04

8515-4B

C 08 B 37/08

6779-4C

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑭ 発明の名称 ヒアルロン酸の精製法

⑰ 特 願 昭61-156774

⑱ 出 願 昭61(1986)7月3日

⑲ 発 明 者 村 田 英 城 山口県防府市自力町1-18  
 ⑲ 発 明 者 塩 見 道 夫 山口県防府市協和町2-1-11  
 ⑲ 発 明 者 石 井 真 三 山口県防府市協和町2-2-403  
 ⑰ 出 願 人 協和醗酵工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

ヒアルロン酸の精製法

## 2. 特許請求の範囲

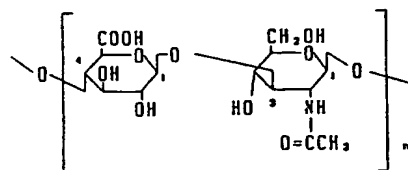
ヒアルロン酸を含有する液からヒアルロン酸を分離、精製する際に、マクロレティキュラー型陰イオン交換樹脂を用いることを特徴とするヒアルロン酸の精製法。

## 3. 発明の詳細な説明

## 産業上の利用分野

本発明は、ヒアルロン酸の精製法に関する。

ヒアルロン酸は構造式



で示される多糖類の一種であり、硝子体、へその緒、関節液、皮膚、大動脈内外膜などに含まれ、水分の保持、湿潤剤的な役割、細菌類の侵入防止などに役立っている。この物質は、最近、化粧品、目、皮膚、関節などの治療剤、手術の保護剤など

として開発されている。

## 従 来 の 技 術

ストレプトコッカス属のある群の細菌の莢膜成分としてヒアルロン酸が存在することは古くから知られている〔エイ・ピー・マクレナン(A. P. MacLennan): ジャーナル・オブ・ジェネラル・マイクロバイオロジー(J. Gen. Microbiol.), 15, 485-491, 1956〕。また、糖成分3%以上の栄養培地で通気攪拌培養を行い、ヒアルロン酸を製造する方法が知られている(特開昭58-56692)。

従来の技術において、発酵液中に不純物として存在する高分子化合物を除去する方法としては、トリクロル酢酸やクロロホルム-イソアミルアルコールで処理したり、蛋白分解酵素を使用したり、あるいはセチルピリジウムクロライドなどでヒアルロン酸を選択的に沈殿させる方法などが用いられている。

## 発明が解決しようとする問題点

ヒアルロン酸は、化粧品の原料としての用途が増大し、さらに医薬品としての用途も期待されている。ヒアルロン酸を医薬品として使用するには、蛋白質、核酸、発熱性物質などを含まない精製品であることが必須条件である。また、その有効性は分子量が大きく粘度が高いほどよいとも言われ

特開昭63-12293(2)

ている。

従来用いられるヒアルロン酸の分離精製法は、工程が煩雑であり、使用する薬剤が高価で、またその薬剤の毒性の問題などがあり、工業的に有利な方法ではない。従って、工業的に有利なヒアルロン酸の精製法の開発が求められている。

#### 問題点を解決するための手段

本発明者は、ヒアルロン酸や不純物として存在する高分子化合物が陰電荷を有する物質であることに着目し、イオン交換樹脂を用いるヒアルロン酸の精製法を検討した。その結果、陰イオン交換樹脂は、一般に蛋白質、核酸、発熱性物質およびヒアルロン酸をよく吸着するが、ジビニルベンゼン含量の高いマクロレティキュラー型陰イオン交換樹脂は、高分子のヒアルロン酸だけを吸着しないという現象を見出し本発明を完成した。

以下に本発明を詳細に説明する。

本発明は、ヒアルロン酸を含有する液からヒアルロン酸を分離、精製する際に、マクロレティキュラー型陰イオン交換樹脂を用いることを特徴とするヒアルロン酸の精製法を提供する。

本発明に用いられるマクロレティキュラー型の陰イオン交換樹脂とは、マクロポーラス型ともハイポーラス型とも称されるジビニルベンゼン含量

併用することも可能である。無機塩としては例えば塩化ナトリウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、チオ硫酸ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、塩化カルシウム、炭酸カルシウムなどが使用できる。もちろん天然栄養源を用いたときなどに天然物中に含有する無機塩のみで満足させることが可能なときもある。また必要に応じて各種ビタミン、例えばチアミン、ニコチン酸、ピオチン、パントテン酸などが使用できる。

培養は、振盪培養、通気培養などの好気的条件下で行う。培養温度は25～42℃で、好ましくは30～38℃が適当である。培養時のpHは5～9が適当である。pH調節はアンモニア水、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸カルシウムなどによって行う。

培養期間は通常2～4日間でヒアルロン酸は主として菌体外に蓄積する。

上記のようにして得られたヒアルロン酸培養液からのヒアルロン酸の精製は、下記のようにして行う。

ヒアルロン酸培養液を水でヒアルロン酸が0.5～2g/ℓ好ましくは1g/ℓ程度になるように希釈し、1～10% (v/v) 程度のカーボンを追加

の高いスチレン系の陰イオン交換樹脂で、例えば三菱化成工業社製のダイヤイオンHPA-25、HPA-75、アンバーライト社製のIRA-900、IRA-904などがあげられる。使用する陰イオン交換樹脂の量は、ヒアルロン酸を2～10g/ℓの範囲で含む液の量を1とした場合0.7～1 (v/v) 程度が望ましい。

本発明は、発酵法によって得られるヒアルロン酸を含む培養液に適用するのが好ましい。

発酵法により得られるヒアルロン酸培養液は、ヒアルロン酸生産能を有する微生物（例えば、ストレプトコッカス・ゾーエビデミクスNCTC 7023）を用いて、以下に示すような培養方法で培養を行うことにより得ることができる。

培地としては、炭素源、窒素源、無機物その他の栄養物を程よく含有するものであれば、合成培地、天然培地のいずれも使用できる。炭素源としてはグルコース、シュクロース、乳糖蜜、澱粉加水分解物などが使用できる。窒素源としてはペプトン、ポリペプトン、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、ブレイン・ハート・インヒュージョン、馬血清などの有機栄養源の添加が望ましく、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウム、アンモニアなどを

して15～30℃で1時間程度攪拌して培養液と水を混合した後、スッチェなどでろ過し濾液を得る。このカーボン処理液をマクロレティキュラー型陰イオン交換樹脂に、空間速度 (S. V.) 1～2 (h<sup>-1</sup>) で通塔して、処理液を得る。この処理液のpHを塩酸などで中性付近に調整して、1mol/ℓ程度になるように塩化ナトリウムを加えた後、アセトン、メタノール、エタノール、n-プロパノール、イソ-プロパノール、アセトニトリルなどの水溶性有機溶媒を処理液に対して1～4倍量添加して、粗ヒアルロン酸ナトリウムの沈殿を析出させる。沈殿を分離した後、得られた沈殿を0.2mol/ℓ程度の塩化ナトリウム水溶液に溶解し、再度、アセトン、メタノール、エタノール、n-プロパノール、イソ-プロパノール、アセトニトリルなどの水溶性有機溶媒を添加してヒアルロン酸ナトリウムの沈殿を析出させ、母液と沈殿を分離する。得られた沈殿を50～100%濃度のメタノール、エタノール、n-プロパノール、イソ-プロパノール、アセトン、アセトニトリルなどの溶液で洗浄し、真空乾燥して精製ヒアルロン酸を得ることができる。

本発明方法により得られる精製ヒアルロン酸は、常に100cp以上の粘度を示し、極限粘度法 (バイ

オキミカ・エ・バイオフィジカ・アクト(Biochim. Biophys. Acta) 42, 476, (1960) ] による分子量は200万以上である。

培養液中に存在するヒアルロン酸の分子量はどのバッチにおいても一定というわけではない。従って、培養液中の全ヒアルロン酸を分子量を選択せずに精製するとその粘度は60cpから100cp程度まで種々の粘度を示す。しかし、本発明方法によれば、蛋白質、核酸、発熱性物質および分子量の小さいヒアルロン酸がマクロレティキュラー型陰イオン交換樹脂に吸着されるため、分子量200万以上のヒアルロン酸が取得できる。

また、本発明は現在市販されている製品を再精製する際にも用いることができる。現在市販されているヒアルロン酸は、ニワトリのトサカなどからの抽出物が主であるが、本発明方法で精製すれば、収率はさがるものの分子量150万以上のヒアルロン酸の精製品を得ることができる。

市販されている製品を再精製するには、ヒアルロン酸ナトリウムを0.5～2g/l程度になるよう水に溶解したものを、マクロレティキュラー型陰イオン交換樹脂に、空間速度(S.V.)1～2(h<sup>-1</sup>)で通塔して、以下はヒアルロン酸培養液の精製と同様にして精製ヒアルロン酸ナトリウム

を得ることができる。

以下に本発明の実施例を示す。

#### 実施例1

ストレプトコッカス・ゾーエビデミクスNCTC 7023 [ジャーナル・オブ・ジェネラル・マイクロバイオロジー(J. Gen. Microbiol.) 15, 485～491(1956)] をブレイン・ハート・インヒュージョン寒天培地(日水製薬社製)で37℃、16時間培養した菌体を、グルコース1%、ペプトン1.5%、酵母エキス0.5%、コーンステープリカー1%、グルタミン酸ナトリウム0.3%、リン酸二カリウム0.2%、硫酸マグネシウム0.05%、チオ硫酸ナトリウム0.1%、炭酸カルシウム2%からなる種培地(pH7.0)300mlに接種し、37℃、16時間振盪培養した。この種培養液150mlをグルコース2.5%、ペプトン1.5%、酵母エキス0.5%、コーンステープリカー0.5%、リン酸二カリウム0.2%、硫酸マグネシウム0.005%、チオ硫酸ナトリウム0.1%からなる発酵培地(pH7.2)3lを含む5l容ジャーファーメンターに接種し37℃、通気量0.3vvm、pH7.0にて26時間培養して、ヒアルロン酸培養液を得た。このヒアルロン酸培養液3lをイオン交換水で20lに希釈し、カーボン200gを添加し、室温で1

時間攪拌した後、ヌッチェで濾過を行い、カーボン処理液20lを得た。このカーボン処理液から、次の3つの方法により、それぞれ精製ヒアルロン酸を製造した。

#### (1) 対象区A

カーボン処理液20lに1.2kgのNaClを加え、16lのアセトンを添加してヒアルロン酸ナトリウムの沈殿を得た。この沈殿を分離しエタノール洗浄、真空乾燥した結果、精製ヒアルロン酸12.8gが得られた。

#### (2) 対象区B

カーボン処理液20lに10%セチルピリジウムクロライド(CPC)水溶液5lを添加し、沈殿物を生じさせた。この沈殿を分離、水洗後、0.3M NaCl水溶液20lに溶解し、アセトン30lを添加してヒアルロン酸ナトリウムの沈殿を得た。この沈殿を分離し、エタノール洗浄、真空乾燥した結果、精製ヒアルロン酸12.5gが得られた。

#### (3) 試験区

カーボン処理液20lを、マクロレティキュラー型陰イオン交換樹脂ダイヤイオンHPA-75(三菱化成工業社製)2.5lに5l/hで通塔し、処理液20lを得た。この処理液のpH

をHClで7.0に調整して、1.2kgのNaClを加え、16lのアセトンを添加してヒアルロン酸ナトリウムの沈殿を得た。この沈殿を分離し、エタノール洗浄、真空乾燥した結果、精製ヒアルロン酸11.5gが得られた。

上記(1)～(3)で得られた精製ヒアルロン酸の蛋白質含量、核酸(260nmにおける吸光度)、粘度、極限粘度を測定し、発熱性試験を行った。その結果を第1表に示す。

第 1 表

|      | 蛋白質含量(%) | 核酸(OD <sub>260nm</sub> (0.1%sol.)) | 発熱性試験 | 粘度(cp) | 極限粘度(dl/g) | 分子量                  |
|------|----------|------------------------------------|-------|--------|------------|----------------------|
| 対象区A | 0.41     | 0.036                              | +     | 62     | 20.6       | 1.26×10 <sup>6</sup> |
| 対象区B | 0.10     | 0.010                              | +     | 76     | 20.6       | 1.26×10 <sup>6</sup> |
| 試験区  | 0.01     | 0.001                              | -     | 150    | 33.0       | 2.30×10 <sup>6</sup> |

注) 測定は下記の方法を用いた。

蛋白質含量: フォリン法にて測定した。

核酸: 0.1%ヒアルロン酸ナトリウム溶液の260nmにおける吸光度を測定した。

発熱性試験: ヒアルロン酸ナトリウムを0.1%の濃度に生理食塩水に溶解し、10ml/kgをウサギに静注した。

粘度：0.1%ヒアルロン酸ナトリウム水溶液をB L型回転粘度計(60rpm、ローターNo 2、30℃)にて測定した。

極限粘度：極限粘度法〔バイオキミカ・エ・バイオフィジカ・アクタ(Biochim. Biophys. Acta) 42, 476, (1960)〕に従い、ウペローデ型粘度計を用いて、0.2M NaCl水溶液、25℃にて測定した。

分子量：極限粘度＝

$36 \times (\text{分子量})^{0.78} \times 10^{-5}$ より算出

#### 実施例2

キュービー社製ヒアルロン酸ナトリウム1gを1ℓの水に溶解し、三菱化成工業社製ダイヤイオンHPA-75(OH)200mlに400ml/hの流速で通液し処理液1.2ℓを得た。処理液に含まれるヒアルロン酸ナトリウムの量は312mgであり、約70%は樹脂により吸着除去された。処理液のpHを塩酸で7.0とし70gのNaClを加えたのち1ℓのアセトンを添加してヒアルロン酸ナトリウムの沈殿を得た。この沈殿を分離し、真空乾燥して精製ヒアルロン酸ナトリウム305mgを得た。精製前後のサンプルの粘度、極限粘度および分子量を実施例1と同様の方法で測定した

ところ、第2表に示したとおりであり、天然物由来のヒアルロン酸についても、本発明方法の有効性が証明された。

第 2 表

|     | 粘 度<br>(cp) | 極限粘度<br>(dl/g) | 分 子 量              |
|-----|-------------|----------------|--------------------|
| 精製前 | 9.2         | 16.7           | $0.96 \times 10^6$ |
| 精製後 | 102         | 23.6           | $1.50 \times 10^6$ |

#### 発 明 の 効 果

本発明によれば、蛋白質、核酸、発熱性物質を含まない分子量200万以上の高分子量の精製ヒアルロン酸を得ることができる。

特許出願人 (102) 協和醗酵工業株式会社

代表者 加 藤 幹 夫



#### 手続補正書 (自発)

昭和61年 8 月 6 日

特許庁長官 殿

#### 1 事件の表示

昭和61年特許願第156774号

#### 2 発明の名称

ヒアルロン酸の精製法

#### 3 補正をする者

事件との関係 特許出願人

郵便番号 100

住 所 東京都千代田区大手町一丁目6番1号

名 称 (102) 協和醗酵工業株式会社

(TEL: 03-201-7211内線3391)

代表者 加 藤 幹 夫



#### 4 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

#### 5 補正の内容

- (1) 明細書第6頁9～10行の「アセトニトリル」を削除する。

- (2) 明細書第6頁11行の「粗ヒアルロン酸」を「ヒアルロン酸」に訂正する。

- (3) 明細書第6頁12～18行の「沈澱を分離した後、…を分離する。」を削除する。

- (4) 明細書第6頁18～21行の「メタノール、…溶液」を「エタノール」に訂正する。

特  
R1.